

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特 許 公 報(B2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-61278

(24)(44)公告日 平成6年(1994)8月17日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C12Q 1/32

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

6807-4B

請求項の数10(全 18 頁)

(21)出願番号 特願平2-249776

(22)出願日 平成2年(1990)9月18日

(65)公開番号 特開平4-126099

(43)公開日 平成4年(1992)4月27日

微生物の受託番号 FERM BP-3013

(71)出願人 999999999

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 植田 成

静岡県田方郡菰山町南条1421-237

(72)発明者 高橋 守

静岡県駿東郡清水町柿田684-1

(72)発明者 美崎 英生

静岡県田方郡大仁町三福839-1

(72)発明者 今村 茂行

静岡県田方郡大仁町三福236-3

(74)代理人 弁理士 小林 和憲 (外1名)

審査官 伊藤 明

(54)【発明の名称】 ミオイノシトールの高感度定量法および定量用組成物

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】被検液に、

①チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類(以下、チオNADP類という)およびチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類(以下、チオNAD類という)のいずれか1つと、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート類(以下、NADP類という)およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類

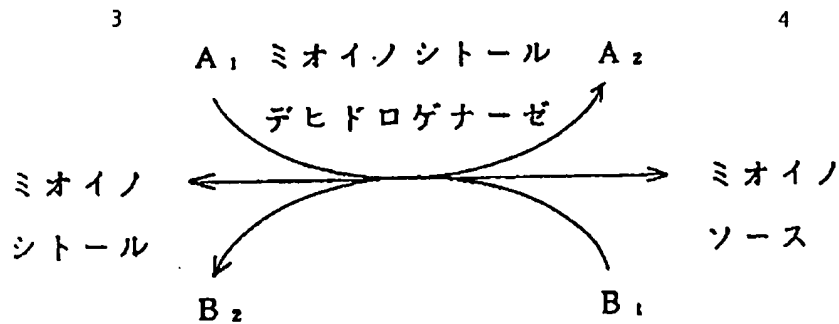
2

(以下、NAD類という)からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

②A<sub>1</sub>、

③B<sub>1</sub>、

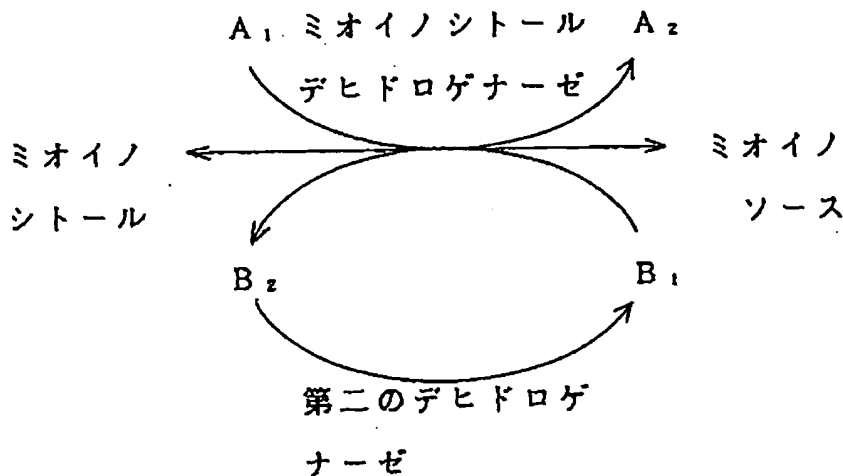
を含有する試薬を作用せしめて、次の反応式



(式中、 $A_1$  はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 $A_2$  は $A_1$  の還元型生成物を示し、 $B_1$  は $A_1$  がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 $A_1$  がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 $B_2$  は $B_1$  の酸化型生成物を示す) で表されるサイクリング反応を形成せしめ、該反応によって変化する $A_2$  または $B_1$  の量を決定することを特徴とするミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項2】被験液に、

\*20 次の反応式



(式中、 $A_1$  はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 $A_2$  は $A_1$  の還元型生成物を示し、 $B_1$  は $A_1$  がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 $A_1$  がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 $B_2$  は $B_1$  の酸化型生成物を示し、 $B_2$  から $B_1$  への反応は $B_2$  を補酵素として第二のデヒドロゲナーゼにて $B_1$  を生成する酵素反応を示す) で表されるサイクリング反応を形成せしめ、該反応によって変化する $A_2$  の量を測定することを特徴とするミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項3】被験液に、

①チオNADP類およびチオNAD類のいずれか1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

② $A_1$ 、

③ $B_1$  または/および $B_2$ 、

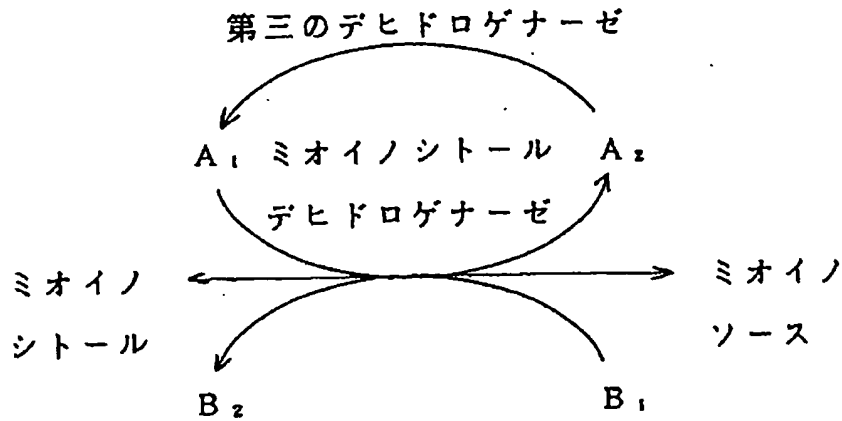
④ミオイノシトールに作用せず、 $B_2$  から $B_1$  への反応を形成する第二のデヒドロゲナーゼおよび該第二のデヒドロゲナーゼの基質、を含有する試薬を作用せしめて、

①チオNADP類およびチオNAD類のいずれか1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

② $A_1$  または/および $A_2$ 、

③ $B_1$ 、

⑤ミオイノシトールに作用せず、 $A_2$  から $A_1$  への反応を形成する第三のデヒドロゲナーゼおよび該第三のデヒドロゲナーゼの基質、を含有する試薬を作用せしめて、次の反応式



(式中、A<sub>1</sub> はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、A<sub>2</sub> はA<sub>1</sub> の還元型生成物を示し、B<sub>1</sub> はA<sub>1</sub> がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、A<sub>1</sub> がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、B<sub>2</sub> はB<sub>1</sub> の酸化型生成物を示し、A<sub>2</sub> からA<sub>1</sub> への反応はA<sub>2</sub> を補酵素として第三のデヒドロゲナーゼにてA<sub>1</sub> を生成する酵素反応を示す)で表されるサイクリング反応を形成せしめ、該反応によって変化するB<sub>1</sub> の量を測定することを特徴とするミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項4】チオNADP類が、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(チオNADP)またはチオニコチンアミドビボキサンチンジヌクレオチドホスフェートである請求項(1)から(3)のいずれかの請求項記載のミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項5】チオNAD類が、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(チオNAD)またはチオニコチンアミドビボキサンチンジヌクレオチドである請求項(1)から(3)のいずれかの請求項記載のミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項6】NADP類が、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(NADP)、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチドホスフェート(アセチルNADP)およびニコチンアミドビボキサンチンジヌクレオチドホスフェート(デアミノNADP)からなる群より選ばれた補酵素である請求項(1)から(3)のいずれかの請求項記載のミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項7】NAD類が、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド(アセチルNAD)およびニコチンアミドビボキサンチンジヌクレオチド(デアミノNAD)からなる群より選ばれた補酵素である請求項(1)から(3)のいずれかの請求項記載のミオイノシトールの高感度定量法。

【請求項8】次の成分①～③

①チオNADP類およびチオNAD類のいずれか1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質とし

てミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

②A<sub>1</sub>、

③B<sub>1</sub>、

(但し、A<sub>1</sub> はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、B<sub>1</sub> はA<sub>1</sub> がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、A<sub>1</sub> がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示す)を含有することを特徴とするミオイノシトール定量用組成物。

【請求項9】次の成分①～④

①チオNADP類およびチオNAD類のいずれか1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

②A<sub>1</sub>、

③B<sub>1</sub> または／およびB<sub>2</sub>、

④ミオイノシトールに作用せず、B<sub>2</sub> からB<sub>1</sub> への反応を形成する第二のデヒドロゲナーゼおよび該第二のデヒドロゲナーゼの基質、

(但し、A<sub>1</sub> はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、B<sub>1</sub> はA<sub>1</sub> がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、A<sub>1</sub> がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、B<sub>2</sub> はB<sub>1</sub> の酸化型生成物を示す)を含有することを特徴とするミオイノシトール定量用組成物。

【請求項10】次の成分①～③および⑤

①チオNADP類およびチオNAD類のいずれか1つと、NADP類およびNAD類からなる群より選ばれる1つとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

②A<sub>1</sub> または／およびA<sub>2</sub>、

③B<sub>1</sub>、

⑤ミオイノシトールに作用せず、A<sub>2</sub> からA<sub>1</sub> への反応

を形成する第三のデヒドロゲナーゼおよび該第三のデヒドロゲナーゼの基質、

(但し、 $A_1$  はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 $B_1$  は $A_1$  がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 $A_1$  がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 $A_2$  は $A_1$  の還元型生成物を示す)を含有することを特徴とするミオイノシトール定量用組成物。

〔発明の詳細な説明〕

〔産業上の利用分野〕

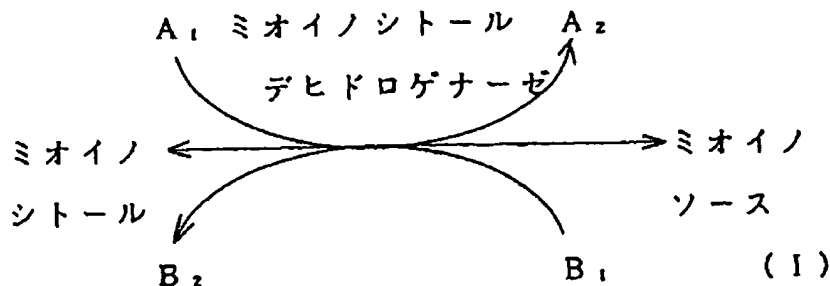
本発明は、臨床生化学検査、食品検査等におけるミオイノシトールの酵素サイクリング反応を用いた新規な高感度測定法およびミオイノシトール定量用組成物に関する。

〔従来の技術〕

ミオイノシトールはイノシトールの9つの異性体の1つで、極めて安定した環状アルコールである。人の場合、ミオイノシトールは食事により1日約1g、腎臓における生合成により約2gが供給され、細胞への取り込みと腎臓における排泄・再吸収および酸化により血漿レベルがほぼ一定になるように調節されている。そのため腎機能障害においては血漿ミオイノシトールレベルの著明な増加が見られる〔臨床科学24巻、11号、1448-1455頁(1988)〕。このようにミオイノシトールを測定することによって腎機能のモニタリングができる。

従来、ミオイノシトールはガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等で測定されているが、検体の前処理が必要であり、また操作も煩雑で臨床検査等大量の検体測定には用い難い。また、正常値も $30\mu\text{mol/l}$ 付近と低値であり〔日本臨床化学会年会記録第28集(1988)〕簡便で高感度な測定方法が望まれている。

\*



(式中、 $A_1$  はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 $A_2$  は $A_1$  の還元型生成物を示し、 $B_1$  は $A_1$  がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 $A_1$  がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 $B_2$  は $B_1$  の酸化型生成物を示す)で表されるサイクリング反応を

\*〔発明が解決しようとする課題〕

微量の基質や酵素活性を酵素サイクリング法として二種類の酵素を用いて増幅する手法が従来より知られている。よく知られたものとしてNADサイクリング、CoAサイクリング、ATPサイクリングなどがあるが、臨床検査等のルーチン分析において操作が煩雑なため、ほとんど用いられていないのが現状である。

本発明者らはミオイノシトールデヒドロゲナーゼ(Enzyme C, 1. 1. 1. 18)がチオNAD(P)類に作用して、サイクリング反応を形成し得ることを見出した。

本発明はNAD及びNADPのアナログであるチオNAD(P)類とNAD(P)類の還元型吸収極大波長が、それぞれ400nm付近、340nm付近と異なっていることを利用したもので、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼを用いた酵素サイクリング反応を実施するにあたり、二種類の補酵素のひとつにチオNAD(P)類を使用して、どちらか一方の補酵素の変化量のみを分別定量することによるものであり、その結果、ミオイノシトールを高感度に測定できる。

すなわち、本発明は被検体に、

①チオニコチンアミダデニンジヌクレオチドホスフェート類(以下、チオNADP類という)及びチオニコチンアミダデニンジヌクレオチド類(以下、チオNAD類という)からなる群より選ばれるひとつと、ニコチンアミダデニンジヌクレオチドホスフェート類(以下、NADP類という)およびニコチンアミダデニンジヌクレオチド類(以下、NAD類という)からなる群より選ばれるひとつとを補酵素とし、少なくともミオイノシトールを基質としてミオイノソースを生成する可逆反応をなすミオイノシトールデヒドロゲナーゼ、

② $A_1$ 、

③ $B_1$ 、

を含有する試薬を作用せしめて、次の反応式(I)

形成せしめ、該反応によって変化する $A_2$ または $B_1$ の量を測定することを特徴とするミオイノシトールの高感度定量法、並びに上記①、②及び③を含有することを特徴とするミオイノシトール定量用組成物を提供するものである。

本発明において、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼとしては、上記条件を具備するものであれば何れのもので

も使用できるが、その具体例として、酵素ハンドブック（朝倉書店p6）記載の本酵素生産菌 *Aerobacter aerogenes* [J. Bio. Chem. 241, 800-806 (1966)]、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens*、*Cryptococcus melibiosum* [Biochem. Biophys. Acta., 293, 295-303 (1973)]、牛脳 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 1133-1138 (1976)] および *Bacillus* sp. NO.3（東洋醸造社製）が挙げられる。しかしながら、*Aerobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens* の三種は標準微生物学第2版（医学書院p209-212）によると肺炎あるいは日和見感染起因菌として化学療法剤、抗生物質に抵抗性を有する難治性感染菌として知られており、このような病原菌を工業的規模で培養することは実質的には困難である。また酵母 *Cryptococcus melibiosum* の生産する酵

素のミオイノシトールに対する  $K_m$  値は約 11.0 mM、NAD に対する  $K_m$  値は約 0.07 mM と記載されており、 $K_m$  値が高いため充分な反応速度が得られ難い。〔酵素ハンドブック、p6〕

そこで、本発明者らは、ミオイノシトールを測定する目的で、危険性のない、培養活性の高い、基質であるミオイノシトールと  $NAD^+$  に対する  $K_m$  値のできるだけ低い、安定で精製の簡単な酵素を生産する菌株を広く自然界よりスクリーニングしたところ、静岡県加茂郡東伊豆町熱川の温泉近くの土壌より分離した *Bacillus* sp. NO. 3 菌株が目的とする性質を有するミオイノシトールデヒドロゲナーゼを産生することを見出した。

本発明者らが見出した *Bacillus* sp. NO.3 の生産するこの酵素は、pH8.5 において測定したミオイノシトールと  $NAD^+$  に対する  $K_m$  値がそれぞれ約 0.6 mM、0.004 mM と非常に低い、反応性の高い性質を有し、かつほぼ 60℃ の緩衝液中で約 15 分間処理した後の活性が、処理前の活性の約 95% 以上の値を保持している性質を有している新規なミオイノシトールデヒドロゲナーゼあり、かつ補酵素として NAD

菌株の一例であって、本菌株の菌学的性質を示すと次の通りである。

#### (a) 形態的特徴

端の丸いまっすぐまたはやや曲がった桿状細菌で大きさは 0.5~0.7×1.5~3.5  $\mu$ m で周毛で運動する。端または亜端に 0.8×1.0~2.0  $\mu$ m の楕円~卵形の芽胞を形成し、芽胞によって菌体は膨張する。多形性なし。

#### (b) 各培地における生育状態

各種培地上で、1~2日、50~52℃で培養し、観察した所見は次の通りである。①普通寒天平板培地 円形で丘状 (convex) の集落を形成する。表面は滑らかで縁は丸い。黄土色~淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

#### ②普通寒天斜面培地

線状に良好に生育する。淡黄土~黄土色を呈する。可溶性色素は産生しない。

#### ③液体培地（ペプトン水）

生育良好で一様に混濁する。

#### ④リトモスミルク培地

4~5日後、弱酸性になる。

DNAのGCモル%：41.9モル%（HPLC法）主たるイソプレノイドキノン：MK-7

(c) 生理的、生化学的性質〔+；陽性、（+）；弱陽性、-；陰性、NT；未実験〕

グラム染色	+
KOH反応	-
カプセル形成	-
抗酸性染色	-
OFテスト	NT
(Hugh-Leifson)	OFテスト
(N源に $NH_4 H_2 PO_4$ )	F
好気での生育	+
嫌気での生育	+
生育温度	70℃
	60℃
	37℃
	30℃
食塩耐性	0%
	3%
	5%
生育pH	5.6
	6.2
	9.0
ゼラチンの分解	-
澱粉の分解	(+)
カゼインの分解	-
エスクリンの分解	+
チロシンの分解	-

11

12

アルギニンの分解	-
セルロースの分解	-
カタラーゼ産生	+
オキシダーゼ産生	+
レシチナーゼ産生	-
ウレアーゼ産生 (SSR)	-
ウレアーゼ産生 (Chris)	-
インドール産生	-
硫化水素産生 (酢酸鉛紙で検出)	-
アセトイン産生 ( $K_2HPO_4$ )	-
アセトイン産生 (NaCl)	-
MRテスト	-
硝酸塩還元テスト (ガス産生)	-
( $NO_2^-$ の検出)	-
( $NO_3^-$ の検出)	+
シモンズ培地での利用性	
クエン酸塩	-
リンゴ酸塩	-
マレイン酸塩	-
マロン酸塩	-
プロピオン酸塩	-
グルコン酸塩	-
コハク酸塩	-
クリステンゼン培地での利用性	
クエン酸塩	+
リンゴ酸塩	-
マレイン酸塩	-
マロン酸塩	-
プロピオン酸塩	+
グルコン酸塩	-
コハク酸塩	+
グルコースよりガスの産生	-
各種糖類より酸の産生	
アドニトール	-
L (+) アラビノース	-
セロビオース	+
ヅルシトール	-
メソ・エリスリトール	-
フラクトース	+
フコース	+
ガラクトース	+
グルコース	+
グリセリン	+
イノシトール	+
イヌリン	+
ラクトース	+
マルトース	+
マンニトール	+
マンノース	+
メレジトース	-

	メリビオース	+
	ラフィノース	-
	ラムノース	+
	D-リボース	+
	サリシン	+
	L-ソルボース	-
	ソルビトール	-
	澱粉	+
	サッカロース	+
10	トレハロース	+
	キシロース	-

以上の通り、本菌株の主性状は、グラム陽性の桿状細菌で、大きさは0.5~0.7×1.5~3.5μm、周毛で運動、芽胞形成、多形性なし、グルコースを醗酵的に分解し、酸を産生する。カタラーゼ・オキシダーゼ産生。高温性の通性嫌気性であり、これらのグラム陽性桿菌で芽胞を形成し、好気で生育する特徴から、バチルス属に属すると判断された。

そこで、本菌株がバチルス属のどの種に属するか否かを

20 同定した。即ち、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2によれば、高温(50℃)で生育する菌種はバチルスアシドカルダリウス(B. acidocaldarius)、バチルスサブチリス(B. subtilis)、バチルスバジウス(B.adius)、バチルスブレビス(B. brevis)、バチルスコアグランス(B. coagulans)、バチルスリケニフォルミス(B. licheniformis)、バチルスバントセンチカス(B. pantothenicus)、バチルスシェゲリ(B. schegell

30 i)、バチルスステアロサーモフィルス(B. steaerothermophilus)の9菌種が記載されている。その内で、嫌気下で生育する菌種はバチルスB. coagulansとB. licheniformisの2菌種のみである。即ち、B. coagulans(以下、「C」と略記することがある)およびB. licheniformis(以下、「L」と略記することがある)と本菌とを対比した結果は、次の通りである。

尚、C、Lおよび本菌で示される「+」は陽性、

40 「(+)」は弱陽性、「-」は陰性、「d」は菌株によって異なる、NDはデータなしであることを示す。

	C	L	本菌
オキシダーゼ産生	-	d	+
芽胞による膨張	d	-	+
嫌気生育	+	+	+
アセトイン産生	+	+	-
グルコース(酸)	+	+	+
L・アラビノース(酸)	+	+	+
キシロース	d	+	-

	13		14
	C	L	本菌
マンニット(酸)	d	+	+
カゼイン分解	d	+	-
ゲラチン分解	d	+	-
デンプン分解	-	+	(+)
クエン酸塩利用	+	+	-
プロピオン酸塩利用	d	+	-
チロシン分解	-	+	-
LV反応	-	+	-
インドール産生	-	+	-
食塩耐性	2%	+	+
	5%	-	-
	7%	-	-
	10%	-	ND
生育温度	40℃	+	+
	50℃	+	+
	55℃	+	+
	60℃	ND	ND
	70℃	-	-
硝酸塩還元	d	+	-
DNAのGCモル%	44.5	46.4	41.9
	(Type)	(Type)	
	44.3	42.9	
	~50.3	~49.9	

以上対比した結果によれば、本菌株NO.3の諸性状は*Bacillus coagulans*に近いと考えられるが、アセトイン産生能、DNAのGCモル%、また上記対比表には載せていないが、リトモスミルク培地での反応も違っている。

よって、本菌株を公知のものと区別するため、バチルス・エスピーNO.3 (*Bacillus* sp. NO.3)と命名し、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研条寄第3013号 (FERM BP-3013)として寄託した。

本発明においては、先ずバチルス属に属するミオイノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が適当な培地に培養される。

上記のミオイノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌としては、前述のバチルス・エスピーNO.3が挙げられるが、細菌の一般的性状として菌学上の性質は変異し得るものであるから、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射、放射線照射または変異誘導剤、例えばN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネートなどを用いる人工的変異手段により変異し得る人工変異株は勿論、自然変異株も含め、バチルス属に属し、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼを生産する能力を有する菌株は、すべて本発明に使用することができる。

上記の培養は、細菌の培養に一般に用いられる条件によって行うことができるが、本菌株の培養にあたっては、

10 ミオイノシトールデヒドロゲナーゼがミオイノシトールによって誘導的に生成される誘導酵素であることから、例えばミオイノシトール0.5%~5%を含む培地で培養することが、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの生産性を10~300倍程度良好とするので好ましい。培地としては、ミオイノシトールを添加する以外に微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらには必要に応じ、無機塩などを含有させた栄養培地が使用される。

20 同化し得る炭素源としては、グルコース、フラクトース、サッカロースなどが単独または組み合わせて用いられる。消化し得る窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、その他、鉄、マンガンなどの種々の重金属塩などが使用される。上記以外に公知の同化し得る炭素源、消化し得る窒素源が使用できることはいうまでもない。

30 培養は、通常振とうまたは通気攪拌培養などの好気的条件下で行うのがよく、工業的には深部通気攪拌培養が好ましい。培養温度はミオイノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が発育し、本酵素を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は40~60℃、特に50℃付近が好ましい。培養時間は培養条件によって異なるが、本酵素が最高力価に達する時期を見計らって適当な時期に培養すればよいが、通常は1~2日間程度である。

40 これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気性などの培養条件は使用する菌株の種類や外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることは言うまでもない。液体培養において発泡があるときは、シリコン油、植物油などの消泡剤が適宜使用される。

このようにして得られたミオイノシトールデヒドロゲナーゼは、主として菌体内に含有されるので、得られた培養物から濾過または遠心分離等の手段により集菌し、この菌体を超音波処理、フレンチプレス処理、ガラスビーズ処理、凍結破碎処理等の機械的破壊手段やリゾチーム等の酵素的破壊手段等の種々の菌体処理手段を適宜組み合わせて、粗製のミオイノシトールデヒドロゲナーゼ含有液が得られる。

次いで、この粗製のミオイノシトールデヒドロゲナーゼ含有液から公知の蛋白質、酵素等の単離、精製手段を用いることによりさらに精製されたミオイノシトールデヒドロゲナーゼを得ることができる。例えば粗製のミオイノシトールデヒドロゲナーゼ含有液に、硫酸、硫酸ナトリウム等を添加する塩析沈澱法により本酵素を回収すればよい。さらにこの沈澱物は、分子篩、各種の樹脂を用いたクロマトグラフィー法、電気泳動法あるいは超遠心分析法を適宜組み合わせ用いて、必要に応じて精製すればよく、その精製手段としては、目的とするミオイノシ

トールデヒドロゲナーゼの性質を利用した手段を用いればよく、例えば上記の沈澱物を水または緩衝液に溶解した後、必要に応じて半透膜にて透析し、さらにDEAE-セルロース、DEAE-セファセル、DEAE-セファロース、DEAE-セファデックス、Q-セファロース（ファルマシア製）、DEAE-トヨパール（東洋曹達社製）ハイドロキシルアバタイト等のイオン交換樹脂や、オクチルセファロース、フェニルセファロース

（ファルマシア社製）等の疎水クロマト樹脂や、その他のアフィニティークロマト樹脂が使用される。また、セファデックスG-100、セファアクリルS-200等のゲル濾過剤による分子篩クロマトや、さらに必要に応じて透析膜を用いて脱塩すればよい。その後、必要に応じて糖類、例えばマンニトール、サッカロース、ソルビトール等、アミノ酸、例えばグルタミン酸、グリシン等、ペプチドまたは蛋白質として牛血清アルブミン等の安定剤の0.05~10%程度を添加し、凍結乾燥後の処理により精製されたミオイノシトールデヒドロゲナーゼの粉体を得ることができる。

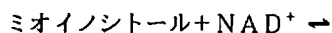
ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの性状は以下の通りである。

#### (1)基質特異性

ミオイノシトール	100%
グルコース	0
フルクトース	0
ガラクトース	0
ソルビトール	0
マンノース	0
マルトース	0
サッカロース	0
ラクトース	0

#### (2)酵素作用

下記式に示すように少なくともミオイノシトールおよびNAD<sup>+</sup>よりミオイノソースおよびNADHを生成する反応を触媒する。



\* (2, 4, 6/3, 5-ベンタヒドロキシシクロヘキサノン)

#### (3)分子量

130,000±15,000

トーソー社製TSKゲル3000SW (0.75×60 cm) による値、溶出液: 0.2M NaCl含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)、標準品はオリエンタル酵母社製の次の分子量マーカーを使用。

M. W. 12,400	シトクロムC
M. W. 32,000	アデニレイトキナーゼ
M. W. 67,000	牛血清アルブミン
M. W. 142,000	ラクテートデヒドロゲナーゼ

M. W. 290,000      グルタメートデヒドロゲナーゼ

#### (4)等電点

pH4.5±0.5

キャリアアンフォライトを用いる焦点電気泳動法により4℃、700Vの定電圧で40時間通電した後、分画し、各画分の酵素活性を測定した。

#### (5)Km値

100mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.5)、

5U ジアフォラーゼ (東洋醸造社製)、

1mM NAD<sup>+</sup> (オリエンタル酵母社製)、

0.025% NTB (和光純薬工業社製)

0.1%牛血清アルブミン (シグマ社製)

を含む反応液中でミオイノシトールの濃度を変化させて、ミオイノシトールに対するKm値を測定した結果は、0.64mMの値を示した。

一方、前記反応液中でNAD<sup>+</sup>の代わりに15mMのミオイノシトールを添加し、NAD<sup>+</sup>の濃度を変化させてNAD<sup>+</sup>に対するKm値を測定した結果は、0.004mMの値を示した。

また、補酵素として1mMのNAD<sup>+</sup>の代わりに1mMチオNAD<sup>+</sup> (シグマ社製)を用いて同様にミオイノシトールに対するKm値を測定した結果は10.0mMの値を示した。

一方、チオNAD<sup>+</sup>の代わりに150mMのミオイノシトールを添加したところ、チオNAD<sup>+</sup>に対するKm値は0.17mMの値を示した。さらに、NADP<sup>+</sup>とミオイノシトールとの反応におけるNADP<sup>+</sup>に対するKm値は0.19mM、ミオイノシトールに対するKm値は30.91mMであり、さらにまたチオNADP<sup>+</sup>とミオイノシトールの反応におけるチオNADP<sup>+</sup>に対するKm値は2.54mM、ミオイノシトールに対するKm値は179.62mMであった。

また以上のことから、本酵素はNAD(P)<sup>+</sup>のみならず、チオNAD(P)<sup>+</sup>についても補酵素として利用するものであることが明らかである。

#### (6)至適pH

後記の酵素活性測定法に従い、反応液中の100mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.5)に代えて100mMのリン酸緩衝液 (pH6.5~8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液 (pH8.0~9.0、-□-) およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.0~10.0、-■-) の各緩衝液を用いて測定した活性の相対値の結果は第4図に示す通りであって、pH9.5付近で最大の活性を示す。

#### (7)pH安定性

本酵素 (1μ/ml) を40mMの酢酸緩衝液 (pH4.5~6.0、-▲-)、リン酸緩衝液 (pH6.0~8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液 (pH8.0~9.5、-□-) およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH



9. 0~10. 0、-■-)の各緩衝液で調製し、50℃で15分間加熱処理した後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第3図に示す通りであって、pH6. 5~9. 0の範囲で80%以上の活性を保持している。

#### (8)熱安定性

本酵素液(1μ/㎖)を20mMリン酸緩衝液(pH7)で調製し、15分間加熱処理後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第1図に示される通りであって、60℃までは残存活性として95%以上を有する安定なものであった。

#### (9)至適温度

100mMトリス塩酸緩衝液(pH8. 5)を用い、後記の酵素活性測定法に従い、35、40、45、50、55、60および65℃の各温度で10分間反応後、0. 1N塩酸2㎖で反応を停止し、波長550nmで吸光度を測定した相対値の結果は、第2図に示す通りであって、60℃付近で最大の活性を有している。

$$(A_1 - A_0)$$

$$U / \text{m l} = \frac{\quad}{18.3} \times \frac{\quad}{10} \times \frac{\quad}{0.02} \times X$$

18. 3 ; 分子吸光係数  $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$

X ; 希釈倍数

前記反応式(I)において $A_1$ および $B_2$ はチオNADP類、チオNAD類、NADP類、NAD類を示すが、チオNADP類またはチオNAD類としては、例えばチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(チオNADP)、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート、およびチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(チオNAD)、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドが挙げられ、又、NADP類またはNAD類としては、例えばニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(NADP)、アセチルビリジンアデニンジヌクレオチドホスフェート(アセチルNADP)、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドホスフェート(デアミノNADP) ; 及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、アセチルビリジンアデニンジヌクレオチド(アセチルNAD)、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド(デアミノNAD)が挙げられる。

本発明の $A_1$ および $B_1$ において例えば $A_1$ がチオNAD(P)類である場合 $B_1$ はNAD(P)H類であることが必要であり、 $B_1$ がチオNAD(P)類である場合 $A_1$ はNAD(P)類であることが必要であり、 $A_1$ および $B_1$ の関係において1つのチオ型補酵素を使用するものである。

又、定量に用いるミオイノシトールデヒドロゲナーゼが

\* (10)ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性測定法

#### ①反応液組成

100mM トリス塩酸緩衝液(pH8. 5)、  
15mM ミオイノシトール(和光純薬社製)  
1mM NAD<sup>+</sup>(オリエンタル酵母社製)  
5U ジアフォラーゼ(東洋醸造社製)、  
0. 025%NBT(和光純薬工業社製)、  
0. 1%牛血清アルブミン(シグマ社製)

#### ②酵素活性測定

上記の反応液1㎖を小試験管に入れ、37℃で5分間インキュベートした後に、適当に希釈した酵素液0. 02㎖を添加して攪拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に、0. 1N塩酸2. 0㎖を添加して攪拌し、反応を停止して、 $A_{550\text{nm}}$ を測定して吸光度 $A_1$ を求める。上記反応液よりミオイノシトールを除いた反応液を用いて同様の測定を行い、その吸光度 $A_0$ を求める。

#### ③

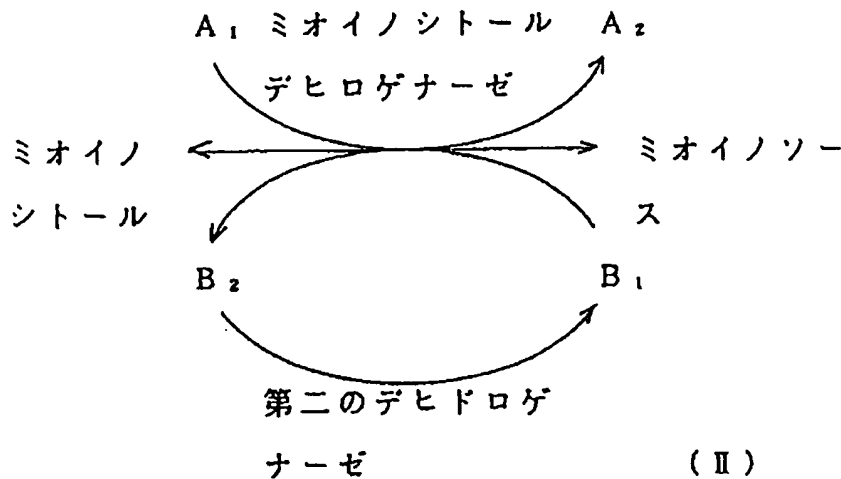
$$1 \quad 3.02$$

チオNAD類とNAD類を補酵素とする場合は、上述のチオNAD類とNAD類より、また、用いるミオイノシトールデヒドロゲナーゼがチオNAD(P)類及びNAD(P)類を共に補酵素とする場合は、上述のチオNAD類及びチオNADP類とNAD類及びNADP類より適宜選択して用いればよい。

$A_1$ および $B_1$ の量は、被検体中のミオイノシトールの量に比較して過剰量であり、またミオイノシトールデヒドロゲナーゼの $A_1$ 及び $B_1$ それぞれに対する $K_m$ 値に比較しても過剰量であることが必要であり、特にミオイノシトール量の20~10000倍モルが好ましい。

本発明のミオイノシトール定量用組成物においては、 $A_1$ 及び $B_1$ の濃度は0. 02~100mM、特に0. 05~20mMが好ましく、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの量は5~1000μ/㎖、特に20~500μ/㎖が好ましいが、その量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

また、本発明定量法は更に被検体に④成分としてミオイノシトールに作用せず、 $B_2 \rightarrow B_1$ の反応を形成する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの基質を組み合わせることで作用せしめることにより、後記反応式(II)のごとく、 $B_1$ と $B_2$ の間に $B_1$ の再生のための反応系を付与せしめることによりミオイノシトールのサイクリング反応を形成せしめ得る。この場合、定量の際には反応により生成した $A_2$ の量を測定する。



(式中、 $A_1$  はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、 $A_2$  は $A_1$  の還元型生成物を示し、 $B_1$  は $A_1$  がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、 $A_1$  がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、 $B_2$  は $B_1$  の酸化型生成物を示し、 $B_2 \rightarrow B_1$  への反応は $B_2$  を補酵素として第二のデヒドロゲナーゼにて $B_1$  を生成する酵素反応を示す)

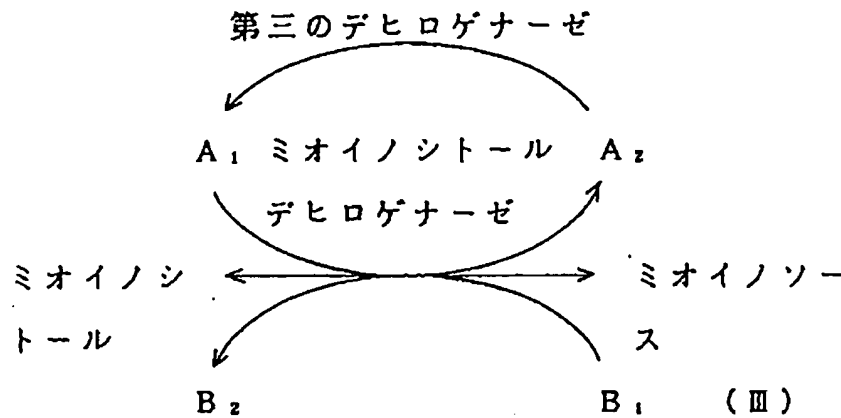
すなわち、第二のデヒドロゲナーゼは $B_1$  の再生のために補助的に添加するものであり、これによって $B_1$  の使用量を少なくすることが可能となり、特に $B_1$  が高価な場合は有効である。又、 $B_1$  の代わりに $B_2$  あるいは $B_1$  と $B_2$  の混合物を用いて反応を行ってもよい。この場合、 $B_1$  または $B_2$  の使用量は特に限定されるものではないが、一般的には $A_1$  の1/10モル以下が好ましく、より好ましくは1/50~1/1000モルまたはそれ以下であってもよい。

この成分④を用いるミオイノシトール定量用組成物において、 $A_1$  の濃度は0.02~100mM、特に0.05~20mMが好ましく、 $B_2$  または $B_1$  の濃度は0.05~5000 $\mu$ M、特に5~500 $\mu$ Mが好ましく、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの濃度は5~1000 $\mu$ /mℓ、特に20~500 $\mu$ /mℓが好ましく、第二のデヒドロゲナーゼは $B_2$  に対する $K_m$ 値(mM単位)の20倍量( $\mu$ /mℓ単位)以上になるように調製すればよく、例えば1~100 $\mu$ /mℓが好ましく、また第二のデヒドロゲナーゼの基質は過剰量、例えば0.05~20mMが好ましい。これらの量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

第二のデヒドロゲナーゼ及び第二のデヒドロゲナーゼの基質としては、例えば、 $B_2$  がNAD類またはチオNAD類のときは、アルコールデヒドロゲナーゼ(EC.

1. 1. 1. 1)とエタノール、グリセロールデヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 6)(*E. Coli*由来)とグリセロール、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 8)(ウサギ筋肉由来)とL-グリセロール-3-リン酸、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 37)(ブタ心筋、ウシ心筋由来)とL-リンゴ酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 12)(ウサギ骨格筋、肝、酵母、*E. Coli*由来)とD-グリセロアルデヒドリン酸とリン酸、 $B_2$  がNADP類またはチオNADP類のときは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 49)(酵母由来)とグルコース-6-リン酸、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 42)(酵母、ブタ心筋由来)とイソクエン酸、グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 2. 1. 17)(*Pseudomonas oxalaticus*由来)とCoAとグリオキシル酸、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 44)(ラット肝、ビール酵母、*E. Coli*由来)と6-ホスホ-D-グルコン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 2. 1. 13)(植物葉緑体由来)とD-グリセロアルデヒド-3-リン酸とリン酸、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ(EC. 1. 2. 1. 7)(*Pseudomonas fluorescens*由来)とベンズアルデヒド等が挙げられる。

更にまた、本発明定量法は更に被検体に⑤成分としてミオイノシトールに作用せず、 $A_2 \rightarrow A_1$  への反応を形成する第3のデヒドロゲナーゼ及び該第3のデヒドロゲナーゼの基質を作用せしめることにより、後記反応式(II I)の如く、 $A_1$  と $A_2$  の間に $A_1$  の再生の為の反応系を付与せしめることによりミオイノシトールのサイクリング反応を形成し得る。この場合、定量の際に $B_1$  の消費量を測定する。



(式中、A<sub>1</sub>はチオNADP類、チオNAD類、NADP類またはNAD類を示し、A<sub>2</sub>はA<sub>1</sub>の還元型生成物を示し、B<sub>1</sub>はA<sub>1</sub>がチオNADP類またはチオNAD類のときは還元型NADP類または還元型NAD類を、A<sub>1</sub>がNADP類またはNAD類のときは還元型チオNADP類または還元型チオNAD類を示し、B<sub>2</sub>はB<sub>1</sub>の酸化型生成物を示し、A<sub>2</sub>→A<sub>1</sub>への反応はA<sub>2</sub>を補酵素として第三のデヒドロゲナーゼにてA<sub>1</sub>を生成する酵素反応を示す)

すなわち、第三のデヒドロゲナーゼはA<sub>1</sub>の再生のために補助的に添加するものであり、これによってA<sub>1</sub>の使用量を少なくすることが可能となり、特にA<sub>1</sub>が高価な場合には有効である。又、A<sub>1</sub>の代わりにA<sub>2</sub>あるいはA<sub>1</sub>とA<sub>2</sub>の混合物を用いて反応を行ってもよい。この場合、A<sub>1</sub>または/及びA<sub>2</sub>の使用量は特に限定されるものではないが、一般的にはB<sub>1</sub>の1/10モル以下が好ましく、より好ましくは1/50～1/1000モルまたはそれ以下であってもよい。

この成分⑤を用いるミオイノシトール定量用組成物において、B<sub>1</sub>の濃度は0.02～100mM、特に0.05～20mMが好ましく、A<sub>2</sub>または/及びA<sub>1</sub>の濃度は0.05～5000μM、特に5～500μMが好ましく、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの濃度は5～1000μ/mℓ、特に20～500μ/mℓが好ましく、第三のデヒドロゲナーゼはA<sub>2</sub>に対するKm値(mM値)の20倍量(μ/mℓ単位)以上になるように調製すればよく、例えば1～100μ/mℓが好ましく、また第三のデヒドロゲナーゼの基質は過剰量、例えば0.05～20mMが好ましい。これらの量は被検体の種類等により適宜決定することができ、これ以上の量を用いることもできる。

第三のデヒドロゲナーゼ及びその基質としては、例えばA<sub>1</sub>がNAD類またはチオNAD類のときは、アルコールデヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 1)とアセトアルデヒド、グリセロールデヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 6)(E. Coli由来)とジヒドロキシアセトン、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 8)(ウサギ筋肉由来)とジヒド

ロキシアセトリン酸、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 37)(ブタ心筋、ウシ心筋由来)とオキサロ酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 12)(ウサギ骨格筋、肝、酵母、E. Coli由来)と1, 3-ジホスホ-D-グリセリン酸、A<sub>1</sub>がNADP類またはチオNADP類のときは、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 1. 1. 49)(酵母由来)とグルコノラクトン-6-リン酸、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(EC. 1. 2. 1. 1. 3)(植物葉緑体由来)と1, 3-ジホスホ-D-グリセリン等が挙げられる。

本発明のミオイノシトール定量用組成物の調製にあたって、使用できるミオイノシトールデヒドロゲナーゼに関しては、例えば補酵素としてNAD類(好ましくはNAD)、チオNAD類(好ましくはチオNAD)、あるいはNADP類(好ましくはNADP)、チオNADP類(好ましくはチオNADP)を用いて基質であるミオイノシトールに対する反応性を有するものであればよく、本発明の知見に基づき、これら補酵素と基質を用いて確認できるものである。

反応液組成については、使用するミオイノシトールデヒドロゲナーゼの各種補酵素間の相対活性等を考慮して二種の補酵素を適宜選択し、その後正反応/逆反応の至適pHの間でpH条件をサイクリング反応が効率よく進行するように設定すればよい。例えばBacillus, s.p. NO. 3(東洋醸造社製)由来のミオイノシトールデヒドロゲナーゼについてみれば、補酵素にチオNADを用いた場合のNADを用いた場合に対する相対活性は約10～15%であり、又、正反応の至適pHは9.5付近で、また逆反応の至適pHは7～7.5である。本酵素は更にNAD類のみでなくNADP類をも補酵素とする。これら使用する酵素は単独でも、あるいは適宜2種以上を組み合わせ用いてもよい。

かくして、調製された本発明のミオイノシトール定量用組成物によって被検体中のミオイノシトールを測定するには、上記成分①～③、①～④、あるいは①～③及び⑤を含有する組成物に被検体0.001～0.5mℓを加

え、約37℃の温度にて反応させ、反応開始一定時間後の2点間の数分ないし数十分間、例えば3分後と4分後の1分間、または3分後と8分後の5分間における生成されたA<sub>2</sub>の量または消費されたB<sub>1</sub>の量を、それぞれの吸収波長に基づく吸光度の変化によって測定すればよい。例えば、A<sub>2</sub>がチオNADH、B<sub>1</sub>がNADHの場合、A<sub>2</sub>の生成を400nmの吸光度の増加により測定するか、あるいはB<sub>1</sub>の消費を340nmの吸光度の減少により測定し、既知濃度のミオイノシトールを用いて測定したときの値と比較すれば、被検液中のミオイノシトール量をリアルタイムで求めることができる。

また、本発明定量法は、被検液中のミオイノシトールそのものを酵素サイクリング反応に導くものであり、被検液中の共存物質の影響を受けにくい、被検液のブランク測定を省略することができ、レイトアッセイによる簡便な測定を成し得る。

尚、本発明においてはA<sub>2</sub>またはB<sub>1</sub>の測定に当たり、吸光度速度の代わりに他の公知の測定法を使用して定量を行うこともできる。

#### 〔発明の効果〕

上述のごとく、本発明は還元型の吸収波長の異なる補酵素を用いるため測定誤差を生じず、また、酵素サイクリング反応を組み合わせることによって感度を増大させることができるため、少量の検体で迅速かつ正確に被検体中のミオイノシトールを定量することができる。特に60℃にて95%以上の残存活性を有する熱に安定なミオイノシトールデヒドロゲナーゼを用いることが好ましい。

#### 〔実施例〕

次いで本発明の実施例および参考例を挙げて具体的に述べるが、本発明はこれによって何ら限定されるものでない。

#### 参考例1

バチルス・エスピーNO.3の培養：

酵母エキス（極東製薬社製）2%、ペプトン（極東製薬社製）2%、リン酸2カリウム（和光純薬社製）0.2%、塩化カルシウム（和光純薬社製）0.02%、硫酸マグネシウム（和光純薬社製）0.05%、ミオイノシトール（和光純薬社製）2%、pH7.3を含む液体培地100mℓを500mℓ容三角フラスコに分注し、120℃で20分間加熱滅菌した後、これにバチルス・エスピーNO.3の1白金耳を接種し、50℃で120r.p.m.の振とう培養器で30時間培養して種母85mℓ（酵素活性1.2μ/mℓ）を得た。

一方、上記と同様の培地組成にて消泡剤としてディスフォーム442（日本油脂）を0.1%添加した液体培地20Lを30L容ジャーファメンターに仕込み、加熱滅菌した後上記の種母85mℓを移植し、培養温度50℃、通気量20L/分、内圧0.4kg/cm<sup>2</sup>、攪拌速度150r.p.m.で24時間通気培養し、培養物1

8.0L（酵素活性1.8μ/mℓ）を得た。

#### 参考例2

実施例1で得た培養物を遠心分離で集菌し、これに0.1%リゾチーム（エーザイ社製）を含む20mMリン酸緩衝液（pH7.5）5Lを加え、37℃で1時間インキュベイトした後、遠心分離して沈澱物を除去し、上清4.5L（6μ/mℓ）を得た。この上清にアセトンを1.8L添加攪拌し、生じた沈澱物を遠心分離して集め、これを20mMリン酸緩衝液で溶解し1Lの粗酵素液（24.2μ/mℓ）を得た。この溶液に固形硫酸を200g溶解し、生じた沈澱物を遠心分離して除去し、得られた上清に再び固形硫酸を50g溶解した。この処理液を遠心分離して得られた沈澱物を20mMリン酸緩衝液（pH7.5）で溶解し、500mℓの酵素液（36.3μ/mℓ）を得た。この酵素液を透析膜（三光純薬社製）を用いて20Lの20mMリン酸緩衝液（pH7.5）に対して一晚透析し、得られた酵素液を20mMリン酸緩衝液（pH7.5）で緩衝化したDEAEセファロースCL-6B（ファルマシア）250mℓのカラムに通し、0.1M KClを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.5）1Lを流した後、次いで0.3M KClを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.5）で溶出し、酵素液350mℓ（35.2μ/mℓ）を得た。得られた酵素液を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）20Lに対して一晚透析した。こうして得られた酵素液に牛血清アルブミン（シグマ社製）を0.2g溶解した後凍結乾燥して、凍結乾燥標品1.1g（10.6μ/mg）を得た。

#### 実施例1

##### <反応系>

40mM グリシン-NaOH緩衝液（pH10.0）

0.2mM 還元型NAD（オリエンタル酵母）

2mM チオNAD（三共）

150u/mℓ ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ（東洋醸造、バチルス・エスピーNO.3由来）

##### <操作>

上記試薬1mℓをキュベットにとり、0、10、20、30、40、50μMのミオイノシトール溶液をそれぞれ20μℓを添加し、37℃にて反応を開始させた。反応開始後2分目と7分目の400nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。その結果を第5図に示した。第5図から明らかなように、ミオイノシトール量に対する吸光度変化量は良好な直線を示した。

#### 実施例2

##### <反応系>

40mM グリシン-NaOH緩衝液（pH9.5）

0.1 mM 還元型デアミノNAD (シグマ)  
 2 mM チオNAD (三共)  
 200 u/ml ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ  
 (東洋醸造、パチルス・エスビーNO.3由来)

## &lt;操作&gt;

上記試薬1 mlをキュベットにとり、0、2、4、6、8、10  $\mu$ Mのミオイノシトール溶液をそれぞれ50  $\mu$ l添加し、37℃にて60分間反応させたのち、0.5 %ドデシル硫酸ナトリウム液1 mlを加え反応を停止させた。400 nmにける吸光度を測定し、第6図に示すようなような良好な定量曲線を得た。

## 実施例3

## &lt;反応系&gt;

50 mM グリシン-NaOH緩衝液 (pH 10.0)  
 0.2 mM 還元型NAD (オリエンタル酵母)  
 4 mM チオNAD (三共)  
 250 u/ml ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ  
 (東洋醸造、パチルス・エスビーNO.3由来)  
 0.2 % トリトンX-100

## &lt;操作&gt;

キュベットに上記反応液1 mlを加え、37℃にて予備加温する。3種類の血清サンプルをそれぞれについて20  $\mu$ lキュベットに加え、37℃にて反応を開始させた。反応開始後の5分目と6分目の400 nmにおける吸光度を読み取り、その差を計算した。別に、標準液として50  $\mu$ Mミオイノシトール溶液を、また試薬ブランクとしてサンプルの代わりに蒸留水を加えたものそれぞれについて同様の測定を行った。標準液の吸光度差よりそれぞれの血清サンプルのイノシトール濃度を算出し下記の表を得た。

	吸光度差 (mAbs)	ミオイノシトール濃度
試薬ブランク	2	—
標準液	29	50 $\mu$ M
血清1	25	42.6
血清2	21	35.2
血清3	31	53.7

## 実施例4

## &lt;反応系&gt;

40 mM グリシン-NaOH緩衝液 (pH 10.0)  
 15 mM NADP (オリエンタル酵母)  
 50  $\mu$ M チオNAD (三共)  
 0.4 M エタノール

30 u/ml アルコールデヒドロゲナーゼ (オリエンタル酵母)

10 250 u/ml ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ  
 (東洋醸造、パチルス・エスビーNO.3由来)

## &lt;操作&gt;

上記試薬1 mlをキュベットにとり、0、20、40、60、80、100  $\mu$ Mのミオイノシトール溶液をそれぞれ50  $\mu$ l添加し、37℃にて反応を開始させた。はんおう開始後3分目と8分目の340 nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。その結果を第7図に示した。

## 20 実施例5

## &lt;反応系&gt;

50 mM リン緩衝液 (pH7.0)  
 0.25 mM 還元型NADP (オリエンタル酵母)  
 50  $\mu$ M チオNAD (三共)  
 5 mM ジヒドロキシアセトンリン酸  
 10 u/ml グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ベーリンガー社製；ウサギ筋肉由来)

30 250 u/ml ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ  
 (東洋醸造、パチルス・エスビーNO.3由来)

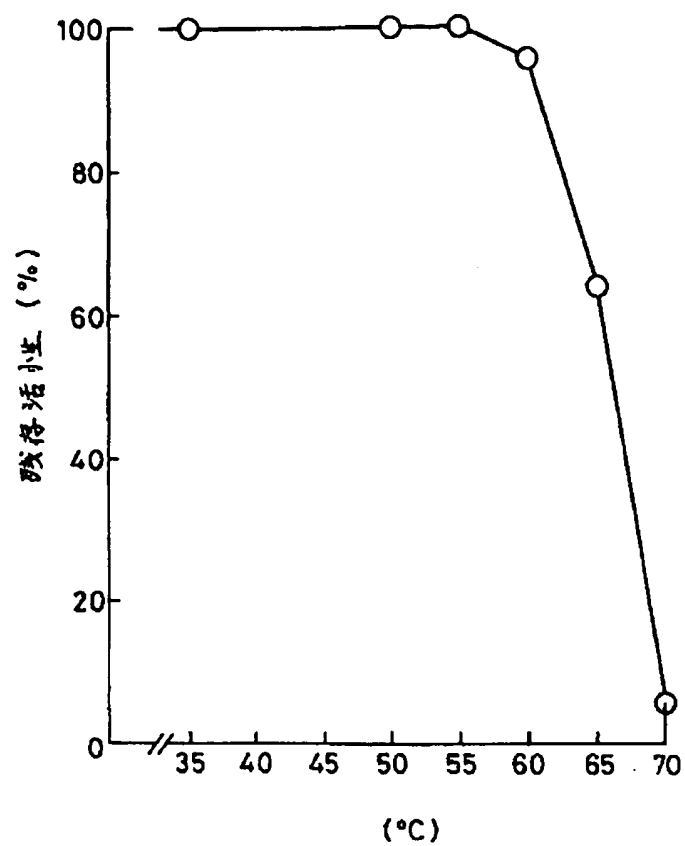
## &lt;操作&gt;

上記試薬1 mlをキュベットにとり、0、50、100、150、200、250  $\mu$ Mのミオイノシトール溶液をそれぞれ50  $\mu$ l添加し、37℃にて反応を開始させた。はんおう開始後3分目と8分目の340 nmにおける吸光度を読み取りその差を求めた。その結果を第8図に示した。

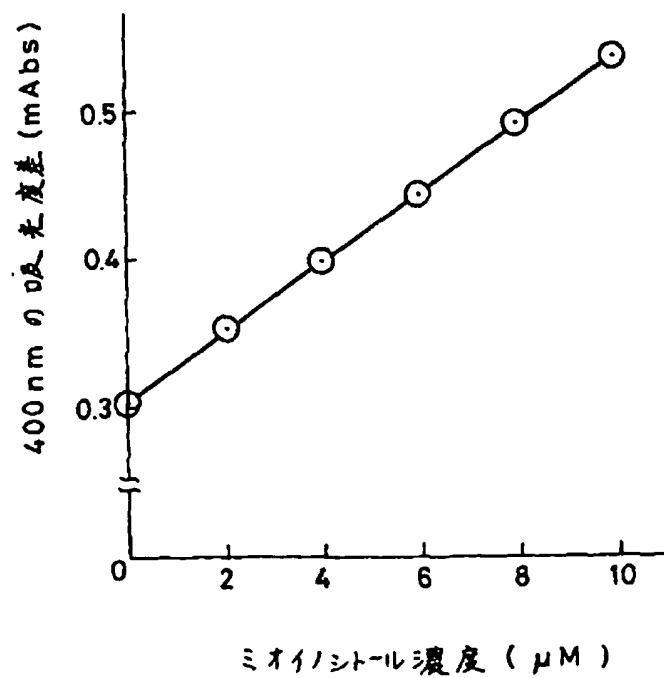
## 40 【図面の簡単な説明】

第1図は本発明のミオイノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す曲線、第2図はその至適温度を示す曲線、第3図はそのpH安定性を示す曲線、第4図はその至適pHを示す曲線、第5図ないし第8図は本発明に基づくミオイノシトールの定量曲線である。

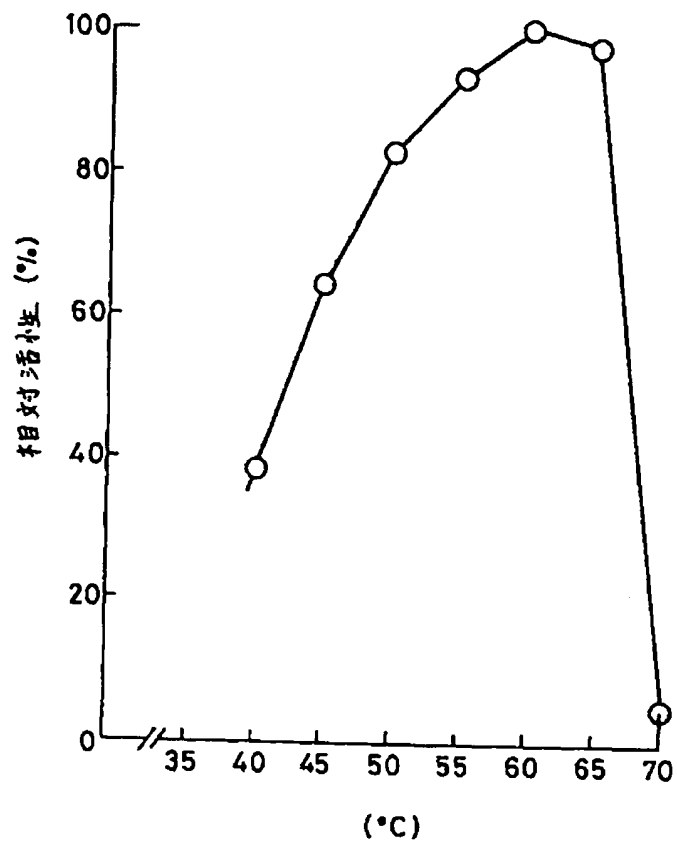
〔第1図〕



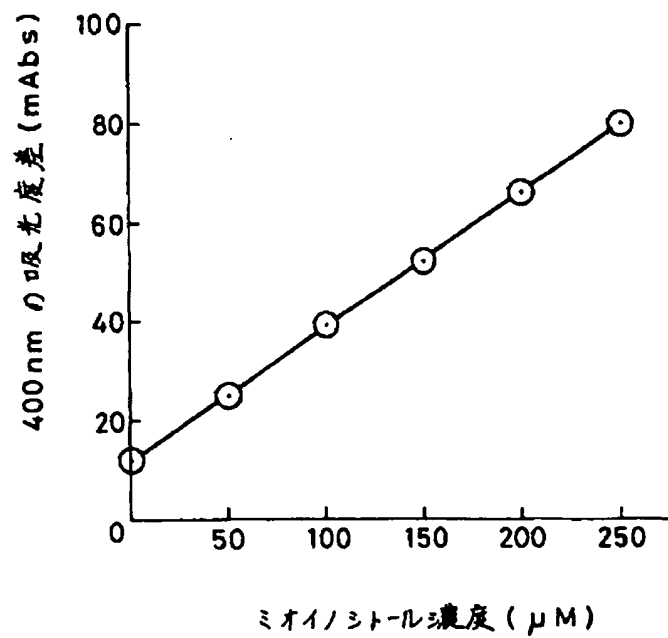
〔第6図〕



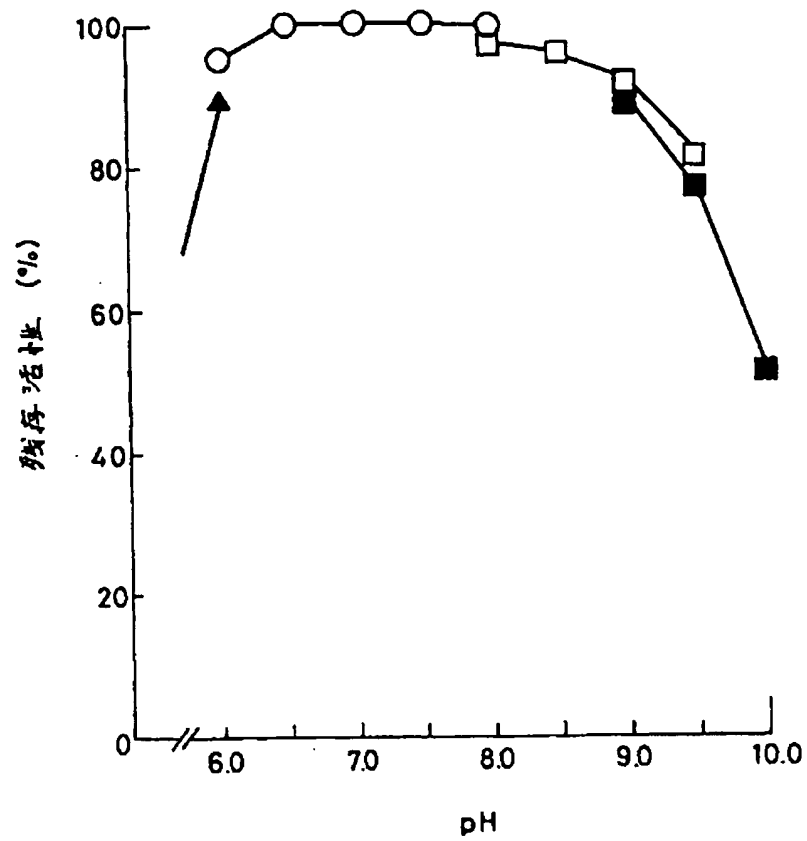
【第2図】



【第8図】

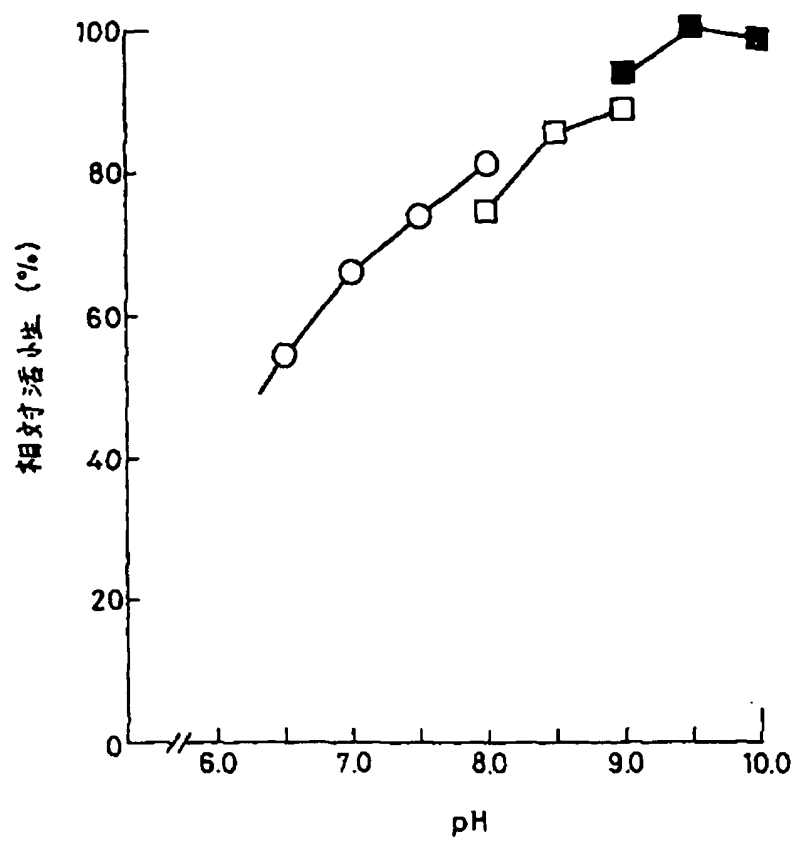


【第3図】

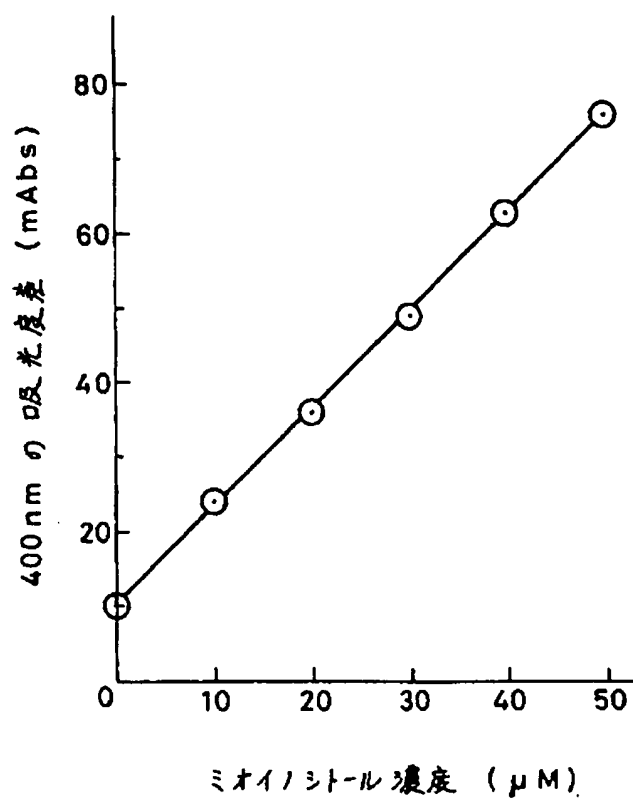




〔第4図〕



【第5図】



【第7図】

